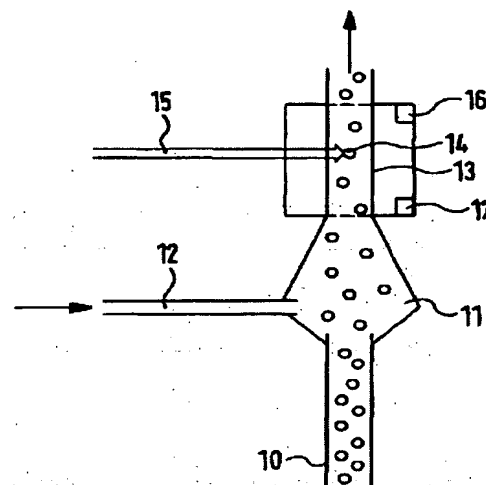


Detecting Meticillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant Enterococci comprises using a flow-through cytometer and fluorescence readings

Patenttinumero: DE19945553
Julkaisupäivä: 2001-03-29
Keksijä: MUELLER HOLGER [DE]
Hakija: MUELLER HOLGER [DE]
Patenttiluokitus
- kansainvälinen G01N33/52; G01N33/569; C12Q1/04
- eurooppalainen G01N33/569D2; G01N33/569D10
Hakemusnumero: DE19991045553 19990923
Etuoikeusnumero(t): DE19991045553 19990923

Tiivistelmä DE19945553

Detecting Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in a flow-through cytometer is new. Detecting Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in a flow-through cytometer, comprises: (a) preparing a bacterial suspension; (b) growing the bacteria in nutrient solution; (c) adding at least one fluorescent-labelled indicator, specific for one of the bacterial species; (d) adding a fluorescent-labelled indicator for damaged cells and an antibiotic to test the resistance; (e) running the suspension through the flow cytometer and radiating each bacteria with a laser; (f) measuring the fluorescence of each bacteria as the laser hits it; and (g) evaluating the total of the single measurements to determine the resistance of the bacteria to the tested antibiotic.



Tiedot saatu esp@cenet tietokannasta - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 45 553 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:
G 01 N 33/52
G 01 N 33/569
C 12 Q 1/04

⑳ Aktenzeichen: 199 45 553.8
㉔ Anmeldetag: 23. 9. 1999
㉕ Offenlegungstag: 29. 3. 2001

DE 199 45 553 A 1

㉑ Anmelder:
Müller, Holger, Dr.med., 73733 Esslingen, DE

㉒ Vertreter:
Patentanwälte Magenbauer, Reimold, Vetter &
Abel, 73728 Esslingen

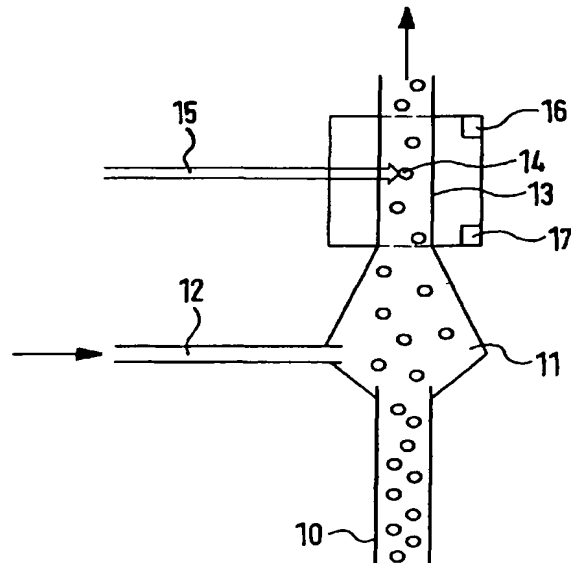
㉓ Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉔ Verfahren zum Nachweis von mindestens einer multiresistenten Keimart, insbesondere MRSA- und VRE-Keimen

㉕ Es wird ein Verfahren zum Nachweis von mindestens einer multiresistenten Keimart, insbesondere von MRSA- und VRE-Keimen, unter Verwendung eines Durchflußzytometers vorgeschlagen, das die folgenden Verfahrensschritte aufweist:

- 1.1 Herstellen einer Keimsuspension,
 - 1.2 Vervielfachung der Keime in einer Nährlösung,
 - 1.3 Zufügen wenigstens eines mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzten Indikators für die jeweils gesuchte Keimart, der sich spezifisch an dieser Keimart anlagert oder ankoppelt,
 - 1.4 Zufügen eines als Indikator für geschädigte Zellen dienenden fluoreszierenden anderen Farbstoffs sowie eines Schlüsselantibiotikums zur Prüfung der Resistenz,
 - 1.5 Durchleiten der so gebildeten Suspension durch das Durchflußzytometer und Bestrahlen der weitgehend vereinzelt Keime nacheinander mit einem Laserstrahl,
 - 1.6 Messen jeweils der den Farbstoffen zugeordneten Fluoreszenzstrahlungen beim Auftreffen des Laserstrahls auf einen zu überprüfenden Keim und
 - 1.7 Auswerten der Vielzahl von Einzelmessungen wenigstens dahingehend, ob und/oder wieviele anteilmäßig oder zahlenmäßig darunter sind, bei denen die jeweils gesuchte Keimart in Verbindung mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum festgestellt wurde.
- Durch dieses Verfahren können multiresistente Keime wesentlich schneller, nämlich innerhalb weniger Stunden, gegenüber bisherigen Nachweisverfahren nachgewiesen werden, wodurch erst eine breitere Überprüfung von Patienten auf das Vorhandensein von ...



DE 199 45 553 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von mindestens einer multiresistenten Keimart, insbesondere von MRSA- und VRE-Keimen.

Multiresistente Keime stellen ein Problem für Krankenhäuser, Pflegeheime, Altenheime und dergleichen dar, da Infektionen durch solche Keime nur sehr schwer beherrschbar sind. Sowohl die erforderlichen Isoliermaßnahmen für die betroffenen Personen als auch die Therapie stellen beträchtliche Kostenfaktoren dar, so daß es von größter Wichtigkeit ist, von solchen multiresistenten Keimen befallene Personen möglichst schnell zu erkennen. In den USA wurden bei mehr als 30% aller Intensivpatienten, in Österreich bei ca. 18% und in Deutschland bei ca. 3% derartige multiresistente Keime festgestellt. Derartige multiresistente Keime stellen eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Spezies dar. Die wichtigsten Vertreter sind MRSA-Keime (Meticillinresistenter Staphylokokkus aureus) und VRE-Keime (Vancocinresistente Enterokokken).

Die bisher eingesetzten Verfahren zum Nachweis von multiresistenten Keimen sind sehr zeitaufwendig, umständlich und personalintensiv. Zunächst werden über einen Zeitraum von 12-24 Stunden Kulturen mit dem Ziel, sichtbare Einzelkolonien bis in sichtbare Größenordnungen zu züchten, angelegt. Anschließend erfolgt ein mikrobiologischer und/oder chemischer Nachweis der Art der Keime sowie ein Resistenztest, beispielsweise mit geeigneten Antibiotikum-Testplättchen. Der erforderliche große Aufwand und die lange Testphase erlauben eine entsprechende Überprüfung von Personen nur bei dringendem Verdacht auf eine entsprechende Infektion. Mit dem angegebenen (Zeit-)Aufwand können zwar prinzipiell große Serien bearbeitet werden, jedoch bedeutet dies für die jeweiligen Patienten, daß die strengen und kostenintensiven Isoliermaßnahmen entsprechend aufrechterhalten werden müssen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Testsystem zu schaffen, mit dem schneller und einfacher multiresistente Keime nachgewiesen werden können, die Personen, insbesondere Patienten, besiedelt oder infiziert haben.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können derartige multiresistente Keime innerhalb weniger Stunden nachgewiesen werden, da dieses Verfahren zum Nachweis wesentlich weniger Keime und damit weniger Vermehrungszyklen benötigt. Der Nachweis selbst erfolgt dann nahezu vollautomatisch mit einem Durchflußzytometer, das geringere Anforderungen an die Ausbildung der den Test durchführenden Fachkräfte stellt. Das Durchflußzytometer erlaubt dabei schnelle und exakte Messungen, so daß insgesamt ein breiterer Kreis von Personen solchen Tests unterzogen werden kann oder sogar Reihenuntersuchungen bei realisierbarem Aufwand möglich werden.

Durch die in den Unteransprüchen aufgeführten Maßnahmen sind vorteilhafte Weiterbildungen und Verbesserungen des im Anspruch 1 angegebenen Verfahrens möglich.

Als Indikator für die jeweils gesuchte Keimart eignen sich mit dem Oberflächenantigen dieser gesuchten Keimart verbindende Antikörper, vorzugsweise PerCP-gekoppelte und/oder PE(Phycoerythrin)-gekoppelte Antikörper, die im Durchflußzytometer rot fluoreszieren, und/oder fluorezeingekoppelte (FTTC[Fluorezein-iso-thiocyanat]) Antikörper. Alternativ hierzu kann als Indikator auch ein als Reaktant mit den Oberflächenenzymen der gesuchten Keimart wirkendes Substrat verwendet werden, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

Als Schlüsselantibiotikum eignet sich vor allem das Penicillinderivat Oxacillin, insbesondere zum Nachweis von resistenten MRSA-Keimen, oder Vancomycin, insbesondere zum Nachweis von resistenten VRE-Keimen.

Als Farbstoff zur Prüfung der Resistenz in Verbindung mit dem Schlüsselantibiotikum eignet sich vor allem ein membranpotentialsensitiver Farbstoff, insbesondere ein Oxonol-Farbstoff (DiBAC3) oder ein Carbocyanin-Farbstoff (DiOC3), der im Durchflußzytometer grün fluoresziert, so daß die keimartsspezifische Fluoreszenz deutlich von der resistenzabhängigen Fluoreszenz bei der Messung unterschieden werden kann.

Der die Keime enthaltende Probenstrom wird in vorteilhafter Weise hydrodynamisch fokussiert, bevor er den vom Laserstrahl bestrahlten Meßpunkt passiert, so daß die Keime den Meßpunkt im wesentlichen einzeln passieren und somit individuelle Messungen an den Keimen vorgenommen werden können.

Die verschiedenen Fluoreszenzstrahlungen (z. B. rot und grün) werden mittels eines optischen Detektionssystems bei jedem Meßvorgang quantifiziert, insbesondere durch Erfassung der Strahlungsamplituden oder Strahlungsintensitäten. Zur elektronischen Ausblendung von wesentlich von der gesuchten Keimart abweichenden Keimen wird das ein Maß für die Zellgröße bildende Vorwärtsstreulicht des Laserstrahls und/oder das ein Maß für den Zellinhalt bildende Seitwärtsstreulicht des Laserstrahls erfaßt, wobei Fluoreszenzmessungen an dem jeweils vom Laserstrahl erfaßten Keim nur dann durchgeführt und/oder ausgewertet werden, wenn dieser Keim durch die Streulichterfassung als im gesuchten Toleranzbereich liegend erkannt wird. Hierdurch können exaktere Messungen durch Ausblenden von unerwünschten Messungen und Rauschsignalen erreicht werden.

Zur Auswertung werden bei jedem Meßvorgang die erfaßten Fluoreszenzwerte in eine zwei- oder mehrdimensionale Tabelle eingetragen, wobei Schwellenwerte für die Unterscheidungskriterien Indikation und Resistenz vorgegeben werden. Auch dies dient zur Ausblendung von unerwünschten Signalen und Grundrauschen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen unter Zuhilfenahme der Zeichnungen erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Durchflußzytometers und

Fig. 2 ein Auswertediagramm zum Nachweis des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins der gesuchten multiresistenten Keimart.

Zum Nachweis einer vermuteten multiresistenten Keimart, beispielsweise von MRSA- oder VRE-Keimen, wird zunächst, im Falle MRSA, in üblicher Weise ein Abstrich aus Körperhöhlen (vorzugsweise Nase, Rachen), Wunden und Hautarealen hergestellt, bzw., im Falle VRE, Urin, Stuhl, Sekrete und Anal-Abstriche hergestellt. Aber auch Reinkulturen nach Anzüchtung aus allen üblichen Untersuchungsmaterialien können verwendet werden. Für die Analyse werden nicht konventionelle Wattetupfer verwendet, sondern das Material wird mit sterilen Einmal-Ösen abgestrichen und in die Nährbouillon verbracht. Der Grund liegt in einer Minimierung des Rauschsignals, da sich von Watte Kleinstpartikel ablösen. Danach werden die in der Suspension enthaltenen Keime in einer Nährlösung während einer Zeitdauer von ca. 2-3 Stunden je nach Keim vervielfacht. Eine stärkere Vervielfachung ist beim beschriebenen Verfahren im Gegensatz zum herkömmlichen Nachweisverfahren nicht erforderlich.

Nun wird der Suspension ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzter Indikator für die jeweils gesuchte Keimart zugegeben, der sich spezifisch an diese Keimart anla-

gert oder ankoppelt. Beispielsweise weisen MRSA-Keime als Oberflächenantigen das Protein A auf, während VRE-Keime das Oberflächenantigen Lancefieldgruppe D enthalten. Der Suspension werden daher spezifische Antikörper zugefügt, die sich mit diesen Antigenen zu Komplexen verbinden. Diese Antikörper werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, beispielsweise werden PerCP- und/oder PE(Phycoerythrin)-konjugierte Antikörper verwendet. Liegt die gesuchte Keimart in der Suspension vor, so lagern sich die spezifischen Antikörper an die Antigene und damit an die Keime an, so daß sich Farbstoffkonzentrationen an diesen Keimen bilden. PerCP- und/oder PE-Konjugate fluoreszieren dabei rot. Weiterhin können beispielsweise auch fluorezeingekoppelte (FITC[Fluorescein-iso-thiocyanat]) Antikörper verwendet werden, die grün fluoreszieren. Liegen die gesuchten bzw. vermuteten Keime in der Nährlösung nicht vor, so erfolgt keine Anlagerung und damit keine Farbstoffkonzentration.

Anstelle eines Nachweises eines bestimmten Keims über Antikörper und Antigene können auch mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Substrate, z. B. Fibrinogen, verwendet werden, die sich beispielsweise an den Oberflächenenzymen der gesuchten Keimart anlagern. Auch in diesem Falle kann somit an diesen Keimen eine Farbstoffkonzentration erzielt werden, die mit dem noch zu beschreibenden Durchflußzytometer nachgewiesen werden kann. Ein Substrat kann auch zusammen mit einem Antikörper verwendet werden, um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen.

Nach dem Zufügen des Indikators wird der Suspension ein Schlüsselantibiotikum zugefügt, das den Keim als multiresistent definiert, wenn er dadurch nicht angegriffen bzw. geschädigt wird. Bei MRSA-Keimen wird beispielsweise das Penizillinderivat Oxacillin und bei VRE-Keimen Vancomycin als Schlüsselantibiotikum verwendet. Als Farbstoff wird beispielsweise ein membranpotentialsensitiver Farbstoff, wie der Oxonol-Farbstoff DiBAC3, verwendet. DiBAC3 wird von intakten Zellen nicht aufgenommen. Nur bei durch das Schlüsselantibiotikum geschädigten Zellen kann nach Depolarisation des Membranpotentials der Farbstoff in die geschädigten Zellen eindringen. Der Anteil der infolge dieses Farbstoffs fluoreszierenden Zellen einer Population entspricht somit der Menge der geschädigten Zellen. Bei Resistenz bleiben die Zellen bzw. Keime intakt, so daß der Farbstoff nicht eindringen kann. Oxonol-Farbstoffe bzw. Oxonole fluoreszieren grün.

Anstelle des Oxonol-Farbstoffs DiBAC3 kann beispielsweise auch ein Carbocyanin-Farbstoff, wie DiOC3, zum Nachweis der Resistenz verwendet werden. Die Wirkungsweise ist dabei im wesentlichen umgekehrt. DiOC3 wird in intakten Zellen akkumuliert, die dann grün bzw. gelb-grün fluoreszieren. Nach einer Depolarisation bzw. Schädigung der Zellen durch das Schlüsselantibiotikum bei fehlender Resistenz verläßt der Farbstoff diese wieder, und die Fluoreszenz nimmt ab. Eine nachgewiesene Fluoreszenz ist daher bei diesem Farbstoff ein Indiz für einen resistenten bzw. multiresistenten Keim.

Zum Prüfen der so veränderten Suspension auf eine oder mehrere multiresistente Keimarten, im einfachsten Falle eine, wird nun ein an sich bekanntes Durchflußzytometer mit mindestens zwei Fluoreszenzen verwendet. Solche Durchflußzytometer werden beispielsweise von den Firmen Beckman-Coulter, Becton Dickinson (FACSCalibur-Durchflußzytometer) und Ortho-Instruments angeboten und vertrieben. Nach einer Einwirkungsdauer von beispielsweise 10 Minuten bis zu einer Stunde, je nach Farbstoff und verwendetem Indikator, wird die Suspension in das Zytometer eingegeben, und die Messung kann beginnen. Über eine Leitung 10 werden gemäß Fig. 1 die Keime in der Suspen-

sion einer Fokussierkammer 11 zugeführt. Über eine zweite, seitlich einmündende Leitung 12 wird kontinuierlich Trägerflüssigkeit zugeführt, die den Probenstrom mit den Keimen erfaßt und beschleunigt. Diese sogenannte hydrodynamische Fokussierung gewährleistet, daß die Zellen in einem nachfolgenden Meßrohr 13 einen Meßpunkt 14 einzeln passieren und dadurch einzeln überprüft werden können. Der Meßpunkt 14 wird von einem Laserstrahl 15 bestrahlt, der somit die jeweils passierenden Keime trifft und gegebenenfalls zur Fluoreszenz anregt. Hierfür wird beispielsweise ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet.

Bei jeder so angeregten Zelle wird nun geprüft, ob rote und/oder grüne Fluoreszenzstrahlung auftritt. Diese Fluoreszenzstrahlungen werden mittels eines optischen Detektionssystems erfaßt, das beispielsweise aus zwei Fluoreszenzstrahlungs-Sensoren 16, 17 besteht. Die Meßergebnisse werden in einem Diagramm gemäß Fig. 2 aufgezeichnet. Dabei geben die beiden gestrichelten Linien Schwellenwerte für die beiden Fluoreszenzstrahlungen Fl 1 (grün) und Fl 2 (rot) vor, die empirisch bestimmt werden und darunterliegende Werte als Rauschen oder für die Erkennung als zu geringe Intensität erkennen. Nur Strahlungsintensitäten bzw. -amplituden oberhalb dieser Schwellenwerte werden zur Keimerkennung verwendet. Dies bedeutet, bei einer wesentlichen Ansammlung von Meßpunkten im Bereich 1 liegen multiresistente Keime der gesuchten Art vor, da die fehlende grüne Fluoreszenzstrahlung (z. B. bei Verwendung des Farbstoffs DiBAC3), die Resistenz erkennen läßt, während die vorhandene rote Fluoreszenzstrahlung die gesuchte Keimart anzeigt. Wird eine wesentliche Konzentration im Bereich 2 festgestellt, so bedeutet dies, daß zwar die gesuchte Keimart vorliegt, diese jedoch nicht resistent gegenüber dem Antibiotikum war. Der Bereich 4 definiert Keime, die weder resistent sind, noch der gesuchten Keimart angehören. Schließlich definiert der Bereich 3 Keime, die zwar resistent sind, jedoch nicht der gesuchten Keimart zuzuordnen sind. Der Nachweis einer bestimmten multiresistenten Keimart ist daher nur dann erbracht, wenn sich eine wesentliche Konzentration im Bereich 1 darstellt.

Wird zum Nachweis der Resistenz beispielsweise der Farbstoff DiOC3 verwendet, so zeigt eine festgestellte grüne Fluoreszenzstrahlung bei einem Meßvorgang eine Resistenz an. Der Nachweis einer bestimmten multiresistenten Keimart ist daher bei diesem Farbstoff dann erbracht, wenn sich eine wesentliche Konzentration im Bereich 2 darstellt.

Trifft der Laserstrahl 15 auf eine Zelle bzw. einen Keim, so treten neben der für die eigentliche Messung benötigten Fluoreszenzstrahlung noch ein Vorwärtstreulicht im Bereich 3 bis 100 und ein Seitwärtstreulicht auf. Der Winkel des Vorwärtstreulichts ist ein Maß für die Zellgröße, kleinere Zellen streuen weniger Licht. Das Seitwärtstreulicht, das im Bereich eines rechten Winkels zum einfallenden Lichtstrahl anteilmäßig geringer auftritt, ist ein Maß für die Granularität bzw. den Zellinhalt.

Dieser Effekt kann und wird bei den bekannten Durchflußzytometern als Meßfilter eingesetzt. Bei jedem Meßvorgang einer Zelle im Meßpunkt 14 werden das Vorwärtstreulicht und das Seitwärtstreulicht bestimmt. Dadurch kann festgestellt werden, ob die betreffende Zelle bezüglich ihrer Zellgröße und ihres Zellinhalts ungefähr der gesuchten Zelle entspricht. Nur in diesem Fall wird dann die Fluoreszenzstrahlung für die Messung ausgewertet. Festgestellte, in ihrer Größe oder ihrem Zellinhalt stark abweichende Zellen werden für die Messung ausgeblendet, so daß insgesamt exaktere Meßergebnisse erhalten werden.

Ein weiteres Mittel zur Verbesserung der Meßergebnisse besteht noch darin, daß spezifische Nährlösungen bei der Vorbereitung und Vermehrung verwendet werden, die spe-

ziell die Vermehrung der gesuchten Keime fördern und die Vermehrung anderer Keime verlangsamen oder unterbinden.

Die Erfindung ist selbstverständlich nicht auf die Anwendung der beschriebenen Stoffe beschränkt, sondern es können prinzipiell Indikatoren verwendet werden, die sich speziell an einer, nämlich der gesuchten Keimart anlagern, wobei ein fluoreszierender Farbstoff an diesem Indikator angelagert sein kann oder separat vorliegt und sich dann anlagert, wenn die gesuchte Keimart vorliegt. Weiterhin können auch verschiedene Schlüsselantibiotika zur Prüfung der Resistenz verwendet werden, wobei auch unterschiedliche Mechanismen möglich sind, die bei vorhandener oder nicht vorhandener Resistenz die Anlagerung eines fluoreszierenden Farbstoffs ermöglichen oder verhindern.

In weiterer Ausbildung der Erfindung können statt zwei auch drei oder mehr Kriterien gleichzeitig untersucht werden, wobei eine entsprechende Zahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzeffekte ausgewertet werden muß. Beispielsweise kann auch ein gleichzeitiger Nachweis verschiedener multiresistenter Keimarten durch einen Meßvorgang erfolgen, wozu eine entsprechende Zahl unterschiedlicher Fluoreszenzstrahlungen ausgewertet werden muß.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von mindestens einer multiresistenten Keimart, insbesondere MRSA- und VRE-Keimen, unter Verwendung eines Durchflußzytometers, das die folgenden Verfahrensschritte aufweist:
 - 1.1 Herstellen einer Keimsuspension,
 - 1.2 Vervielfachung der Keime in einer Nährlösung,
 - 1.3 Zufügen wenigstens eines mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzten Indikators für die jeweils gesuchte Keimart, der sich spezifisch an dieser Keimart anlagert oder ankoppelt,
 - 1.4 Zufügen eines als Indikator für geschädigte Zellen dienenden fluoreszierenden anderen Farbstoffs sowie eines Schlüsselantibiotikums zur Prüfung der Resistenz,
 - 1.5 Durchleiten der so gebildeten Suspension durch das Durchflußzytometer und Bestrahlen der weitgehend vereinzelt Keime nacheinander mit einem Laserstrahl,
 - 1.6 Messen jeweils der den Farbstoffen zugeordneten Fluoreszenzstrahlungen beim Auftreffen des Laserstrahls auf einen zu überprüfenden Keim und
 - 1.7 Auswerten der Vielzahl von Einzelmessungen wenigstens dahingehend, ob und/oder wieviele anteilmäßig oder zahlenmäßig darunter sind, bei denen die jeweils gesuchte Keimart in Verbindung mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum festgestellt wurde.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator sich mit den Oberflächenantigenen der gesuchten Keimart verbindende Antikörper verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß PerCP-gekoppelte und/oder PE(Phycoerythrin)-gekoppelte Antikörper, die rot fluoreszieren, und/oder fluoreszeingekoppelte (FTTC[Fluorezein-iso-thiocyanat]) Antikörper, die grün fluoreszieren, verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

chenenzymem der gesuchten Keimart wirkendes Substrat verwendet wird, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Schlüsselantibiotikum das Penizillinderivat Oxacillin, insbesondere für MRSA-Keime, oder Vancomycin, insbesondere für VRE-Keime, verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Farbstoff zur Prüfung der Resistenz in Verbindung mit dem Schlüsselantibiotikum ein membranpotentialsensitiver Farbstoff, insbesondere ein Oxonol-Farbstoff (DiBAC3) oder ein Carbocyanin-Farbstoff (DiOC3), verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der die Keime enthaltende Probenstrom hydrodynamisch fokussiert wird, bevor er den vom Laserstrahl (15) bestrahlten Meßpunkt (14) passiert, so daß die Keime den Meßpunkt im wesentlichen einzeln passieren.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Fluoreszenzstrahlungen mittels eines optischen Detektionssystems (16, 18) bei jedem Meßvorgang quantifiziert werden, insbesondere durch Erfassung der Strahlungsamplituden oder Strahlungsintensitäten.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur elektronischen Ausblendung von wesentlich von der gesuchten Keimart abweichenden Keimen das ein Maß für die Zellgröße bildende Vorwärtsstreulicht des Laserstrahls und/oder das ein Maß für den Zellinhalt bildende Seitwärtsstreulicht des Laserstrahls erfaßt wird, wobei Fluoreszenzmessungen an dem jeweils vom Laserstrahl erfaßten Keim nur dann durchgeführt und/oder ausgewertet werden, wenn dieser Keim durch die Streulichterfassung als im gesuchten Toleranzbereich liegend erkannt wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auswertung bei jedem Meßvorgang die erfaßten Fluoreszenzwerte in eine zwei- oder mehrdimensionale Tabelle eingetragen werden, wobei Schwellenwerte für die Unterscheidungskriterien Indikation und Resistenz vorgegeben werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

